



**Ministero delle Attività Produttive**  
**Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività**  
**Ufficio Italiano Brevetti e Marchi**  
**Ufficio G2**

REC'D 28 AUG 2004  
WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**  
RM2003 A 000344

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

la, il

15 MAR 2004

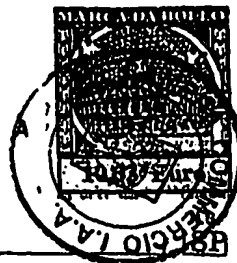
IL FUNZIONARIO

*Elena Marinelli*  
Sig.ra E. MARINELLI

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA  
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite  
Residenza Roma (RM) codice                       
2) Denominazione ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI  
Residenza Milano (MI) codice                     

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dott. Marco Spadaro ed altri cod. fiscale                       
denominazione studio di appartenenza Studio Associato CAVATTONI-RAIMONDI  
via le dei Parioli n. 160 città Roma cap 00197 (prov) RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via                      n.              città                      cap              (prov)             

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci)              gruppo/sottogruppo             

"7-N-poli-amminoalchil(ossi)iminometilcamptotecine recanti gruppi protettivi"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA              N° PROTOCOLLO             

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Giuseppe GIANNINI 3) Maria Ornella TINTI  
2) Sergio PENCO 4) Claudio PISANO

F. PRIORITÀ

nazione e organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

1) nessuna                                                       /            /                           
2)                                                                            /            /                         

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

| N. es. | Doc.      | Descrizione   | Allegato S/R        | Scioglimento Riserve Data                                       | N° Protocollo       |
|--------|-----------|---|---------------------|---|---------------------|
| 1)     | <u>13</u> | <u>PROV</u> riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) | <u>            </u> | <u>            </u> / <u>            </u> / <u>            </u> | <u>            </u> |
| 2)     | <u>10</u> | <u>PROV</u> disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)                              | <u>            </u> | <u>            </u> / <u>            </u> / <u>            </u> | <u>            </u> |
| 3)     | <u>10</u> | <u>RS</u> lettera d'incarico, procura e riferimento procura generale                                  | <u>            </u> | <u>            </u> / <u>            </u> / <u>            </u> | <u>            </u> |
| 4)     | <u>10</u> | <u>RIS</u> designazione inventore   | <u>            </u> | <u>            </u> / <u>            </u> / <u>            </u> | <u>            </u> |
| 5)     | <u>10</u> | <u>RIS</u> documenti di priorità con traduzione in italiano   | <u>            </u> | <u>            </u> / <u>            </u> / <u>            </u> | <u>            </u> |
| 6)     | <u>10</u> | <u>RIS</u> autorizzazione o atto di cessione  | <u>            </u> | <u>            </u> / <u>            </u> / <u>            </u> | <u>            </u> |
| 7)     | <u>10</u> | <u>RIS</u> nominativo completo del richiedente  | <u>            </u> | <u>            </u> / <u>            </u> / <u>            </u> | <u>            </u> |

8) attestati di versamento, totale euro duecentonovantuno/80 obbligatorio

COMPILATO IL 14/07/2003 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I) Dott. Marco SPADARO

CONTINUA SI/NO SI

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA - ROMA codice 68

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA RM 2003 A 000344

L'anno duemilatre, il giorno quattordici, del mese di luglio

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 100 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE  
                    



L'UFFICIALE ROGANTE

## A. RICHIEDENTE (1)

RM 2003 A 000344 n.d.

|                          |               |  |  |        |  |
|--------------------------|---------------|--|--|--------|--|
| <input type="checkbox"/> | Denominazione |  |  | codice |  |
|                          | Residenza     |  |  |        |  |
| <input type="checkbox"/> | Denominazione |  |  | codice |  |
|                          | Residenza     |  |  |        |  |
| <input type="checkbox"/> | Denominazione |  |  | codice |  |
|                          | Residenza     |  |  |        |  |
| <input type="checkbox"/> | Denominazione |  |  | codice |  |
|                          | Residenza     |  |  |        |  |
| <input type="checkbox"/> | Denominazione |  |  | codice |  |
|                          | Residenza     |  |  |        |  |
| <input type="checkbox"/> | Denominazione |  |  | codice |  |
|                          | Residenza     |  |  |        |  |

## E. INVENTORI DESIGNATI

|                     |              |
|---------------------|--------------|
| cognome nome        | cognome nome |
| 105) Loredana VESCI |              |
| 106) Lucio MERLINI  |              |
| 107) Franco ZUNINO  |              |
|                     |              |
|                     |              |
|                     |              |
|                     |              |
|                     |              |
|                     |              |
|                     |              |
|                     |              |

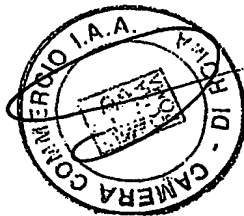
## F. PRIORITÀ

| nazione o organizzazione | tipo di priorità | numero di domanda | data di deposito | allegato<br>S/R | SCIoglimento RISERVE |               |
|--------------------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------|----------------------|---------------|
|                          |                  |                   |                  |                 | Data                 | N° Protocollo |
|                          |                  |                   |                  |                 |                      |               |
|                          |                  |                   |                  |                 |                      |               |
|                          |                  |                   |                  |                 |                      |               |
|                          |                  |                   |                  |                 |                      |               |
|                          |                  |                   |                  |                 |                      |               |
|                          |                  |                   |                  |                 |                      |               |

FIRMA DEL (1) RICHIEDENTE (1)

Dott. Marco SPADARO

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO 14/107/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

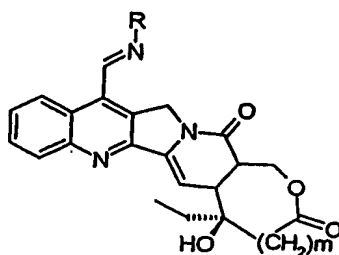
D. TITOLO

BM 2003 A 000344

"7-N-poliamminocil(ossi)imminometilcamptotecine recanti gruppi protettivi"

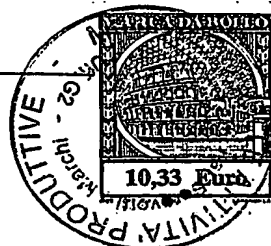
L. RIASSUNTO

Sono descritti composti di formula generale



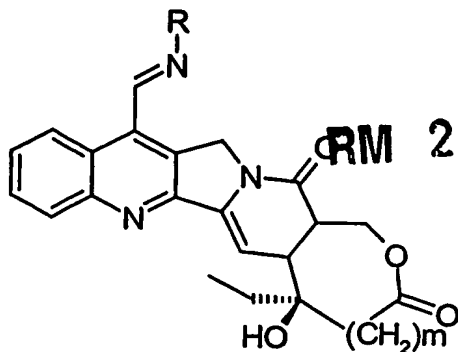
nella quale i gruppi sono come definiti nella descrizione che segue e caratterizzata dalla presenza di sostituenti poliamminici sul residuo imminico/ossimico, tali gruppi amminici essendo a loro volta protetti da opportuni gruppi protettivi. Detti composti sono dotati di potente attività di inibizione della Topoisomerasi I e pertanto sono utili come medicinali per il trattamento di tumori, infezioni virali e parassitarie.

M. DISEGNO



RIASSUNTO

Sono descritti composti di formula generale



nella quale i gruppi sono come definiti nella descrizione che segue e caratterizzata dalla presenza di sostituenti poliamminici sul residuo imminico/ossimico, tali gruppi amminici essendo a loro volta protetti da opportuni gruppi protettivi. Detti composti sono dotati di potente attività di inibizione della Topoisomerasi I e pertanto sono utili come medicamenti per il trattamento di tumori, infezioni virali e parassitarie.

**RM 2003 A 000344**

Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

**"7-N-poli-amminoalchil(ossi)imminometilcamptotecine recanti gruppi  
protettivi"**

a nome: **SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite  
S.p.A.**

**ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA  
CURA DEI TUMORI**

di nazionalità: **italiana**

con sede in: **Viale Shakespeare, 47 - 00144 Roma RM  
Via Venezian, 1 - 20133 Milano MI**

Inventori: **Giuseppe GIANNINI  
Sergio PENCO  
Maria Ornella TINTI  
Claudio PISANO  
Loredana VESCI  
Lucio MERLINI  
Franco ZUNINO**

---000---

La presente invenzione si riferisce a composti utili come medicinali, in particolare a derivati della camptotecina con sostituenti in posizione C-7, contenenti residui poliamminici in cui i residui amminici sono protetti con gruppi protettivi quali il Boc, a procedimenti per la loro preparazione, al loro uso come agenti attivi ad attività inibitrice la Topoisomerasi 1 e a composizioni farmaceutiche che li contengono come ingredienti attivi.

### Sfondo dell'invenzione

La camptotecina è un alcaloide isolato da Wall e al. [*J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88, 3888-3890] per la prima volta dall'albero *Camptoteca acuminata*, una pianta originaria della Cina, della famiglia delle *Nyssaceae*.

La molecola consiste di una struttura pentaciclica con un lattone nell'anello E, essenziale per la citotossicità.

Per una rassegna sulle camptotecine e i problemi connessi al loro utilizzo come medicinali, nonché alla risoluzione di alcuni di tali problemi, si veda EP 1 044 977, a nome delle richiedenti.

Le poliammine sono da tempo oggetto di grande interesse nella *medicinal chemistry*.

Putresceina, spermidina e spermina rappresentano quelle più studiate in quanto naturalmente presenti sia nelle cellule procariotiche che eucariotiche. Il loro ruolo nella fisiologia cellulare sembra molteplice e, per alcuni aspetti, ancora sconosciuto [*J. Med. Chem.*, 2001, 44, 1-26]. Al pH fisiologico questi composti sono presenti come policationi, possono interagire con un'ampia varietà di costituenti cellulari, come RNA, DNA, nucleotidi, proteine e altre sostanze biologiche a carattere acido [*J. Cell Biochem.*, 1991, 46, 37-47].

In oncologia le poliammine sono oggetto di studio per molteplici aspetti: la loro natura policationica a pH fisiologico, l'influenza sui canali ionici delle membrane cellulari, l'interazione con vari

fattori trascrizionali importanti in forme tumorali umane [*Biochemistry* 1999, 38, 14765-74].



La coniugazione di poliammine con farmaci citotossici è stata anche descritta, ad esempio con il clorambucile [*Cancer Res.*, 1992, 52, 4190-5], dove è stato osservato un notevole miglioramento dell'indice terapeutico, ma anche come chemoprevenzione in associazione al 3-indolilcarbinolo [*BMC-Cancer* 2003, 3:2, 1471-2407].

Meno frequente è lo studio di derivati poliamminici in forma protetta: ad esempio N-Benzil-derivati [*J. Med. Chem.*, 2001, 44, 3653-64].

Le poliammine possono essere legate a molecole citotossiche per influenzarne il trasporto cellulare: ad esempio le spermine sono state coniugate alle acridine [*J. Med. Chem.*, 2002, 45, 5098-111] allo scopo di favorirne un rilascio selettivo a livello delle cellule tumorali.

Anche nelle camptotecine (CPT) sono stati inseriti residui poliamminici in posizione 7 come imminometil derivati [*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2001, 11, 291-4], e in particolare il composto derivato dalla spermina è stato descritto nella domanda di brevetto internazionale WO 0053607 a nome del richiedente .

#### Riassunto dell'invenzione

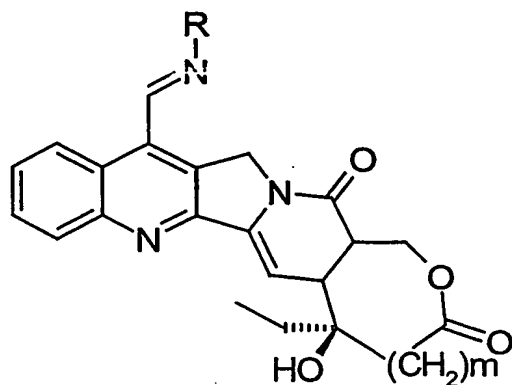
E' stato ora sorprendentemente trovato che camptotecine sostituite in posizione 7 mediante un legame imminometile oppure ossiimminometile, dove i gruppi imminico o ossimico derivano da



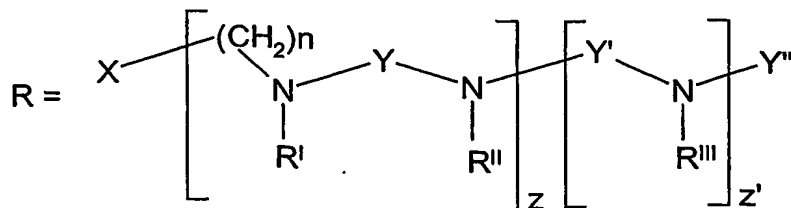
ammine od idrossilammine contenenti residui poliamminoalchilici (es. spermina, spermidina, putresceina), quando sono presenti in forma protetta mostrano una elevata attività antitumorale, nettamente superiore agli stessi derivati non protetti.

Tale potenza antitumorale è paragonabile a composti attualmente in uso nella pratica clinica oncologica, pertanto i derivati oggetto della presente invenzione possono rappresentare un importante contributo per arricchire l'armamentario a disposizione per la lotta contro i tumori.

I composti oggetto della presente invenzione hanno la seguente formula generale (I):



nella quale



m è il numero 0 oppure 1;

Z e Z', uguali o diversi fra loro, sono un numero intero compreso fra 0 e 2;

Y e Y', uguali o diversi fra loro, sono  $(CH_2)_{n_1}$ ;  $(CH_2)_{n_2}$ -  
CH[NR<sup>VII</sup>](CH<sub>2</sub>)<sub>n<sub>4</sub></sub>-NHR<sup>I</sup>](CH<sub>2</sub>)<sub>n<sub>3</sub></sub> oppure

$(CH_2)_{n_2}$ -N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n<sub>4</sub></sub>-NHR<sup>IV</sup>](CH<sub>2</sub>)<sub>n<sub>3</sub></sub>;

Y' è scelto tra H; cicloalcano C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>;  $(CH_2)_{n_5}$ -N[CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>N-  
(CH<sub>2</sub>)<sub>n<sub>6</sub></sub>NHR<sup>V</sup>;  $(CH_2)_{n_7}$ -CH[CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>NR<sup>V</sup>;

X è O, oppure è un legame semplice;

n-n<sub>8</sub>, uguali o diversi fra loro, sono un numero intero  
compreso fra 0 e 5;

R<sup>I</sup>, R<sup>II</sup>, R<sup>III</sup>, R<sup>IV</sup>, R<sup>V</sup> uguali o diversi fra loro sono un gruppo  
protettivo dell'azoto al quale sono legati; CO<sub>2</sub>R<sup>VI</sup>; CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ar;  
CO<sub>2</sub>(9-fluorenilmetil);  $(CH_2)_{n_5}$ -NHCO<sub>2</sub>R<sup>VI</sup>;  $(CH_2)_{n_5}$ -NHCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ar;  
 $(CH_2)_{n_5}$ -NHCO<sub>2</sub>-(9-fluorenilmetil),

R<sup>VI</sup> è un alchile lineare o ramificato (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

R<sup>VII</sup> è H oppure R<sup>I</sup>-R<sup>V</sup>;

Ar rappresenta un residuo aromatico C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, quale fenile, e-  
ventualmente sostituito con uno o più gruppi scelti fra: alogeno,  
idrossi, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alchile, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alcossi, fenile, ciano, nitro, -NR<sup>VIII</sup>R<sup>IX</sup>,  
dove R<sup>VIII</sup> e R<sup>IX</sup>, uguali o diversi fra loro sono idrogeno, (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) al-  
chile lineare o ramificato, oppure

Ar rappresenta un gruppo eterociclico, detto gruppo etero-  
ciclico contenente almeno un eteroatomo scelto fra atomo di azoto,  
eventualmente sostituito con un gruppo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) alchile, e/o ossigeno  
e/o zolfo; detto eterociclico potendo essere sostituito con uno o più  
gruppi scelti fra: alogeno, idrossi, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alchile, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alcossi, fe-

nile, ciano, nitro,  $-NR^{VIII}R^{IX}$ , dove  $R^{VIII}$  e  $R^{IX}$ , uguali o diversi fra loro sono idrogeno,  $(C_1-C_6)$  alchile lineare o ramificato,

gli N1-ossidi, le miscele racemiche, i loro singoli enantiomeri, i loro singoli diastereoisomeri, le forme *E* e *Z*, le loro miscele, i sali farmaceuticamente accettabili.

La presente invenzione comprende l'uso dei composti della suddetta formula generale (I) come principi attivi per medicinali, in particolare per medicinali utili come inibitori della Topoisomerasi I. Tra le applicazioni terapeutiche derivanti dall'attività di inibizione della Topoisomerasi I, si menzionano i tumori, le infezioni da parassiti o da virus.

La presente invenzione comprende composizioni farmaceutiche contenenti composti di formula (I) come principi attivi, in miscela con veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili.

#### Descrizione dettagliata dell'invenzione

Per gruppo protettivo, riferito ai vari  $R^I$ ,  $R^{II}$ ,  $R^{III}$ ,  $R^{IV}$ ,  $R^V$ , si intende un gruppo che favorisca la cattura della molecola da parte della cellula. Mentre la presente invenzione si fonda sulla scoperta che i gruppi protettivi sugli azoti amminici conferiscono potente attività antitumorale alle molecole, e non desiderando gli inventori essere legati ad alcuna considerazione teorica, si ritiene che gruppi protettivi preferiti siano gruppi ingombranti di carattere lipofilo.

Esempi preferiti di gruppi protettivi sono:  $CO_2R^{VI}$ ;  $CO_2CH_2$ -Ar;  $CO_2$ -(9-fluorenilmetil);  $(CH_2)_{n5}-NHCO_2R^{VI}$ ;  $(CH_2)_{n5}-NHCO_2$ -

$\text{CH}_2\text{Ar}$ ;  $(\text{CH}_2)_n\text{-NHCO}_2$ -(9-fluorenilmetil), nei quali i gruppi variabili sono definiti come sopra.;

Un primo gruppo di composti particolarmente preferiti comprende i composti di formula (I), aventi l'anello lattonico a 6 termini ( $m = 0$ ) e, tra questi, in particolare:

- tert-butilestere dell'acido 20S-(4-{[3-(7-camptotecinilidene-ammino)-propil]-tert-butossicarbonil-ammino}-butil)-(3-tert-butossicarbonilamminopropil)-carbammico;
- tert-butilestere dell'acido 20S-(4-{[3-(7-camptotecinilidene-ammino)-propil]-tert-butossicarbonil-ammino}-butil)-carbammico;
- tert-butilestere dell'acido 20S-[3-(7-camptotecinilideneammino)-butil]-carbammico;
- 20S-7-[3-(N-tert-butossicarbonilammino)propossimminometil]-camptotecina.

Un secondo gruppo di composti preferiti comprende i composti di formula (I), aventi l'anello lattonico a 7 termini - la cui sintesi è descritta in [*J.Med.Chem.* 1998, 41, 5410], e, tra questi, in particolare:

- tert-butilestere dell'acido 20RS-(4-{[3-(7-omocamptotecinilidene-ammino)-propil]-tert-butossicarbonil-ammino}-butil)-(3-tert-butossicarbonilamminopropil)-carbammico;
- tert-butilestere dell'acido 20RS-(4-{[3-(7-omocamptotecinilidene-ammino)-propil]-tert-butossicarbonil-ammino}-butil)-carbammico;



- tert-butilestere dell'acido 20RS-[3-(7-omocamptotecinilidene-ammino)-butil]-carbammico;
- 20R,S-7-[3-(N-tertbutossicarbonilammino)propossiammino-metil]-omocamptotecina

I composti descritti nella presente invenzione sono inibitori della Topoisomerasi I e pertanto sono utili come medicinali, in particolare per il trattamento di patologie che beneficiano dell'inibizione di detta Topoisomerasi. In particolare, i composti della presente invenzione mostrano attività antiproliferativa, quindi sono utilizzati per la loro attività terapeutica, e possiedono proprietà chimico-fisiche che li rende adatti alla formulazione in composizioni farmaceutiche.

Le composizioni farmaceutiche comprendono almeno un composto di formula (I) come principio attivo, in una quantità tale da produrre un significativo effetto terapeutico. Le composizioni comprese nella presente invenzione sono del tutto convenzionali e sono ottenute con metodi di comune prassi nell'industria farmaceutica. A seconda della via di somministrazione scelta, le composizioni saranno in forma solida o liquida, adatte alla via orale, parenterale, endovenosa. Le composizioni secondo la presente invenzione comprendono assieme al principio attivo almeno un veicolo o eccipiente farmaceuticamente accettabile. Possono essere particolarmente utili coadiuvanti di formulazione, ad esempio solubilizzanti, disperdenti, agenti di sospensione, emulsionanti.

I composti di formula (I) possono essere anche usati in associazione con altri principi attivi, ad esempio altri farmaci antitumorali o altri farmaci ad attività antiparassitaria o antivirale, sia in forme separate, sia in una unica forma di dosaggio.

I composti secondo la presente invenzione sono utili come medicinali ad attività antitumorale, ad esempio nei tumori del polmone, come il tumore polmonare non microcitoma, tumori del colon-retto, della prostata, gliomi.

I seguenti esempi illustrano ulteriormente l'invenzione.

#### Preparazione 1

##### 7-Formil-camptotecina

Ad una soluzione di 2,0g (4,73 mmoli) di CPT-DMA in 18 mL di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , raffreddata a  $0^\circ\text{C}$ , sono stati aggiunti 12 mL di TFA e qualche goccia di  $\text{H}_2\text{O}$ . Dopo una notte a temperatura ambiente la reazione è completa con formazione di un prodotto con  $R_f = 0,42$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  92:8). La miscela di reazione è stata purificata per cromatografia su  $\text{SiO}_2$  con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (da 98:2 a 92:8) per dare 1,4 g (3,72 mmoli; resa 79%) del prodotto atteso come solido giallo.

#### Preparazione 2

##### $\text{N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -triBoc-spermina

La  $\text{N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -triBoc-spermina è stata preparata in accordo con quanto descritto in letteratura [*Tetrahedron Letters* 1998, 39, 439-42].

#### Preparazione 3

##### $\text{N}',\text{N}''$ -diBoc-spermidina

Il composto è stato preparato con una procedura equivalente a quella descritta per la spermina.

Esempio 1

7-[N-(N',N'',N'''-tert-butoxicarbonil)-sperminimmino-metil]-(20S)-  
Camptotecina.

In un pallone da 100 mL, fiammeggiato, 272 mg (0,72 mmoli) di 7-formil-camptotecina sono stati sciolti in 20 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro. Alla soluzione sono stati aggiunti 44 mg di Yb (OTf)<sub>3</sub> (0,07 mmoli; 0.1 eq.) e quindi, mantenendo il pallone di reazione al riparo dalla luce, 700 mg (1.4 mmoli; 2 eq.) di tri-Boc-spermina sciolta in 12 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e setacci molecolari 0,4 nm. Dopo 16 h a temperatura ambiente sono stati aggiunti 1,9 g (4,2 mmoli; 3 eq. rispetto alla spermina) di una resina funzionalizzata con gruppi isocianato (loading 2,2 mmoli/g) come scavenger dell'ammina in eccesso.

La miscela di reazione è stata lasciata altre 16 h a temperatura ambiente prima di essere filtrata su celite per rimuovere i setacci molecolari e la resina scavenger; il solvente è stato rimosso sotto vuoto ed il grezzo di reazione è stato purificato per cromatografia su HPLC preparativa (CH<sub>3</sub>CN/MeOH=90:10; 8 mL/min; RP-18, 250x25 mm, 7µm) per dare 500 mg (0,58 mmoli; resa 81%) di prodotto come solido giallo.

MS (IS): [MH]<sup>+</sup> = 860,8

[M-1]<sup>-</sup> = 858,7

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 1,0-1,1 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,4-2,0 (m, 35H, 3xtBu+4x $\text{CH}_2$ ), 2,0-2,1 (q, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,0-3,3 (m, 10H, 5x $\text{CH}_2$ ), 3,85-3,95 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5,3-5,4 (d, 1H, CH), 2,55 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5,75-5,85 (d, 1H, CH), 7,7-7,9 (m, 3H, 3xCH), 8,25-8,35 (d, 1H, CH), 8,45-8,55 (d, 1H, CH), 9,4 (s, 1H, CH).



$^{13}\text{C}$  NMR (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8,0; 28,6; 28,7; 31,8; 47,0; 52,7; 66,6; 72,9; 79,5; 97,8; 118,9; 126,2; 127,6; 128,5; 139,3; 130,8; 146,2; 149,9; 150,0; 152,9; 155,7; 157,6; 174,0.

### Esempio 2

7-[N-(N',N''-tert-butossicarbonil)-spermidinimmino-metil]-(20S)-Camptotecina.

Con la stessa procedura di sintesi descritta nell'Esempio 1, è stato ottenuto il prodotto del titolo.

Resa = 22%

MS (IS):  $[\text{MH}]^+ = 704,6$

$[\text{M}+\text{Na}]^+ = 726,6$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 1,0-1,1 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,4-2,1 (m, 26H, 2xtBu+4x $\text{CH}_2$ ), 3,0-3,4 (m, 4H, 2x $\text{CH}_2$ ), 3,75-3,95 (m, 4H, 2x $\text{CH}_2$ ), 5,25-5,35 (d, 1H, CH), 5,55 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5,75-5,85 (d, 1H, CH), 7,7-7,9 (m, 3H, 3xCH), 8,25-8,35 (d, 1H, CH), 8,45-8,55 (d, 1H, CH), 9,4 (s, 1H, CH).

$^{13}\text{C}$  NMR (75,4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8,0; 28,6; 28,7; 32,1; 47,4; 51,7; 52,9; 53,6; 66,7; 69,7; 72,9; 79,7; 98,0; 98,4; 119,0; 122,5; 123,1; 126,4; 127,7; 128,6; 130,2; 130,4; 131,0; 131,3; 146,4; 150,1; 153,1; 156,0; 156,4; 157,9; 174,2.



Esempio 37-[3-(N-tert-butoxicarbonil)-ammino-1-propilossi]-immino-  
metil]-(20S)- Camptotecina (ST2664)

Ad una sospensione di -7-[(3-ammino)propossiimminometil]-20S-camptotecina (20 mg, 0,045 mmoli) in 5 ml di THF anidro si aggiungono 10 mg di (Boc)<sub>2</sub>O (1 equivalente) e 7 µl di Et<sub>3</sub>N (1 equivalente), si lascia reagire a T amb. per 30 h al termine delle quali la reazione è quasi completata. La reazione viene controllata per TLC eluendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 9:1.

Si evapora il THF e si riprende il solido con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, si lava la fase organica con acqua (2 volte) e con salamoia (1 volta). Si anidrica la soluzione con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, si filtra e si tira a secco. Si ottengono 16 mg di prodotto costituito da una miscela di isomeri E e Z (resa: 64%)

R<sub>f</sub>: 0,38 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 98:2.

P.f. 141-142°C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 0,87 (t, H<sub>3</sub>-18E + H<sub>3</sub>-18Z), 1,37 (s, H<sub>9</sub> t-butile E), 1,30 (s, H<sub>9</sub> t-butile Z), 1,67 (m, H<sub>2</sub>-19Z + -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Z), 1,87 (m, H<sub>2</sub>-19E + -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-E), 2,83 (t, CH<sub>2</sub>-N-Z), 3,07 (t, CH<sub>2</sub>-N-E), 4,12 (t, CH<sub>2</sub>-O-Z), 4,35 (t, CH<sub>2</sub>-O-E), 5,17 (s, H-17-Z), 5,32 (s, H-17-E), 5,40 (s, H-5-E), 6,50 (s, OH-E + OH-Z), 6,75 (t, NH-Z), 6,90 (t, NH-E), 7,25 (s, H-14-Z), 7,32 (s, H-14-E), 7,75 (m, H-11-E + H-11-Z), 7,90 (m, H-10-E + H-10-Z), 8,02 (d, H-12-Z), 8,20 (d, H-12-E + H-9-Z), 8,40 (s, -CH=N-Z), 8,6 (d, H-9-E), 9,32 (s, -CH=N-E).

Rapporto E : Z=88 : 22 (da NMR).

Esempio 4

7-[N-(N'-tert-butossicarbonil)-putresceinimmino-metil]-  
(20S)-Camptotecina.

Con la stessa procedura di sintesi descritta nell'Esempio 1, è stato ottenuto il prodotto del titolo.

Resa = 78%

MS (IS):  $[MH]^+ = 547,7$

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 1,0-1,1 (t, 3H,  $CH_3$ ), 1,45 (s, 9H, tBu), 1,65-2,0 (m, 4H,  $2 \times CH_2$ ), 3,2-3,35 (q, 2H,  $CH_2$ ), 3,9-4,0 (t, 2H,  $CH_2$ ), 5,3-5,4 (d, 1H, CH), 5,55 (s, 2H,  $CH_2$ ), 5,75-5,85 (d, 1H, CH), 7,7-7,9 (m, 3H,  $3 \times CH$ ), 8,25-8,35 (d, 1H, CH), 8,45-8,55 (d, 1H, CH), 9,4 (s, 1H, CH).

Esempio 5

7-[4-(N-tert-butossicarbonil)-piperidinil]-metilimminometil-(20S)-  
Camptotecina (ST2665)

Ad una sospensione di 7-formilcamptotecina (60 mg, 0,159 mmoli) in 5 ml di  $CH_2Cl_2$  (distillato su  $CaCl_2$  e conservato su setacci) si aggiungono 119 mg (0,477 mmoli, 3eq.) di 1-Boc-4-amminometil-piperidina cloridrato, 40  $\mu$ l di piridina e 6 mg di  $Yb(OTf)_3$  (10% in peso rispetto all'aldeide) e si lascia reagire a T amb. per 5 giorni (TLC :  $CH_2Cl_2$  :  $CH_3OH$  98 : 2).

Il prodotto viene purificato tramite cromatografia flash (eluente:  $CH_2Cl_2$  :  $CH_3OH$  = 99 : 1). Solido giallo. Resa: 20%. P.f. 200°C dec.

$R_f$  del prodotto di reazione : 0,37 in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 96 : 4$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ;  $\delta$ ): 0,87 (t,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,32 (s, t-butile), 1,67-2,00 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3 + 2\text{-CH}_2\text{-pip.} + \text{-CH pip.}$ ), 2,55-2,85 (m,  $\text{-CH}_2\text{-pip.}$ ), 3,80 (m,  $\text{-CH}_2\text{-N}$ ), 3,97 (m,  $\text{-CH}_2\text{-pip.}$ ), 5,35 (s, H-17), 5,42 (s, H-5), 6,50 (s, OH), 7,35 (s, H-14), 7,70-7,80 (m, H-11), 7,85-7,95 (m, H-10), 8,20 (dd, H-12), 8,72 (dd, H-9), 9,42 (s,  $\text{-CH=N}$ ).

#### Attività citotossica sulle cellule NCI-H460

Le cellule NCI-H460 di carcinoma polmonare non microcitoma umano vennero mantenute in terreno di coltura RPMI 1640 contenente 10% FCS e 1% di glutammina. Il test di citotossicità per analizzare l'attività delle molecole venne effettuato nel modo seguente. Le cellule vennero seminate in un volume di 250  $\mu\text{l}$  in piastre da 96 pozzetti ed incubate per 2 ore a 37 °C con concentrazioni scalari dei prodotti in atmosfera umidificata contenente 5%  $\text{CO}_2$ . Al termine dell'incubazione, le molecole vennero rimosse mediante capovolgimento ed aggiunta di soluzione salina tampinata sterile (PBS) per 3 volte. Il terreno di coltura RPMI 1640 contenente 10% FCS (200  $\mu\text{l}$ ) venne aggiunto nei pozzetti e le piastre incubate per altre 72 ore. Al termine dell'incubazione, le piastre vennero capovolte di nuovo e asciugate su carta, prima di aggiungere 200  $\mu\text{l}$  di PBS e 50  $\mu\text{l}$  di TCA all'80%. Le piastre vennero ancora incubate in ghiaccio per almeno 1 ora. Il TCA venne rimosso mediante capovolgimento, le piastre vennero prima asciugate su carta, quindi lavate tre volte per immersione in acqua distillata e capovolgimento. Le piastre vennero asciugate prima su carta, poi



in incubatore termostato a 60 °C per 10 min. A tutti i pozzetti vennero aggiunti 200 µl di sulforodamina B allo 0.4% in acido acetico 1%. Le piastre vennero incubate a temperatura ambiente per altri 30 min. La sulforodamina B venne rimossa per capovolgimento, le piastre vennero lavate per immersione in acido acetico 1% tre volte, quindi asciugate prima su carta assorbente, poi nel termostato a 60 °C per 10 min. Infine 200 µl di Tris base 10 mM vennero aggiunti a tutti i pozzetti e le piastre messe ad agitare per almeno 20 min. La densità ottica venne misurata con uno spettrofotometro Multiskan a 540 nm. L'incubazione con i prodotti era in grado di inibire la proliferazione in modo concentrazione dipendente. La tabella 1 mostra i valori di IC<sub>50</sub> (concentrazione di prodotto che inibisce la sopravvivenza cellulare del 50%). ST2544 ed ST2598 mostrarono una citotossicità paragonabile e molto potente sulla linea di tumore polmonare.

I risultati sono mostrati nella seguente tabella.

Tabella 1.

Citotossicità dei derivati della camptotecina

| Composto | IC <sub>50</sub> (nM±SD) |
|----------|--------------------------|
| ST2544   | 12,9±1,8                 |
| ST2598   | 15±2                     |

Effetto sul modello del lievito *Saccharomyces cerevisiae* in vitro ed in vivo

Per individuare derivati della camptotecina che superino la farmacoresistenza alla camptotecina indotta da mutazioni puntiformi sulla DNA topisomerasi I nel modello di lievito *Saccharomyces*

ces *Cerevisiae*, vennero utilizzati in parallelo un sistema *in vivo* ed uno *in vitro*.

Per il sistema *in vivo*, il ceppo di lievito EKY3 (*top1Δ*) venne trasformato con i plasmidi YCpGAL1 come controllo, YCpGAL1-hTOP1 e con diversi plasmidi contenenti i mutanti (YCpGAL1-hTOP1G363C, YCpGAL1-hTOP1K720E, YCpGAL1-hTOP1A653 P), che risultano resistenti alla Camptotecina. Alcune mutazioni sono presenti vicino al sito attivo dell'enzima (la Tirosina 723) ed altre intorno alla posizione 363 che corrisponde ad una regione altamente conservata.

Prima di effettuare la trasformazione dei lieviti, i lieviti vennero scongelati e si piastrarono con una ansa sterile in piastre da 90 mm contenenti terreno sterile YPDa solido (10 g di estratto di lievito, 20 g di peptone, 20 g di destrosio, 0.7 g di adenina, 20 g di glucosio, 20 g di agar per litro). Le colonie si formarono dopo 48 – 72 ore in un incubatore a 30 °C.

Un giorno prima della trasformazione, una singola colonia di lievito venne prelevata con una punta Gilson sterile e inoculata in 5 ml di terreno YPDA sterile liquido (il terreno suddetto ad esclusione dell'agar). La colonia venne cresciuta tutta la notte in agitazione a 30 °C. Il giorno dopo 5 ml della coltura satura venne diluita in 100 ml di terreno YPDA sterile liquido e cresciuta a 30 °C fino ad arrivare ad una densità ottica di 1.0 a 600 nm. Le cellule vennero centrifugate per 5 min a 4000 x g, a temperatura ambiente ed il precipitato venne risospeso in 25 ml di una solu-

zione (T/E) contenente Tris-EDTA (TE) 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM ed acetato di litio 100 mM. La sospensione di lievito venne centrifugata per 5 min a 4000 x g a temperatura ambiente. Il precipitato venne risospeso nella stessa soluzione precedente fresca (circa 500 µl), in modo tale da avere  $2 \times 10^9$  cellule/ml. Per effettuare la trasformazione, in una eppendorf vennero messi 200 µg di DNA carrier, 1 µg di DNA plasmidico e 200 µl di cellule competenti. Si aggiunse 1.2 ml di una soluzione di TE/acetato di litio contenente PEG 40% e la sospensione di lievito venne agitata per 30 min a 30 °C. Si eseguì uno shock termico mettendo la sospensione di lievito a 42 °C per 15 min e successivamente venne piastrata in piastre selettive ossia prive di uracile contenenti il terreno minimo completo (CM) (1.3 g di polvere "dropout" comprensiva di diversi aminoacidi ad esclusione dell'uracile, 1.7 g di base azotata del lievito senza aminoacidi e solfato di ammonio, 5 g di solfato di ammonio, 20 g di glucosio e 20 g di agar per litro). Le piastre vennero incubate a 30 °C fino alla trasformazione.

Prima di effettuare il trattamento dei lieviti con i derivati della camptotecina (spot test *in vivo*), le colonie trasformate vennero inoculate con un puntale Gilson in 5 ml di terreno CM liquido sterile. Le colonie vennero cresciute tutta la notte in agitazione a 30 °C. Il giorno dopo venne misurata la densità ottica a 600 nm delle colonie e venne effettuata una diluizione delle colonie per ottenere una densità ottica pari a 0.3. Da questa prima diluizione vennero effettuate diluizioni seriali di 10 volte (1:10, 1:100, 1:1000)

in piastre da 96 pozzetti. 5  $\mu$ l di ogni diluizione vennero pipettati su piastre da 90 mm contenenti terreno CM solido. Per i controlli vennero aggiunti il glucosio 2% o il galattosio 2%, per i trattati con i derivati della camptotecina vennero aggiunti galattosio 2% ed i prodotti alla concentrazione 45  $\mu$ M. Le colonie vennero incubate a 30 °C per 48-72 ore ed analizzate macroscopicamente.

L'effetto dei derivati della camptotecina ST2544 ed ST2598 venne valutato. La DNA Topoisomerasi I wild-type mostrò un fenotipo di sensibilità ad ST2544 e ST2598, mentre gli enzimi mutati G363C e A653P risultarono resistenti ai derivati testati. Il mutante K720E mostrò invece un fenotipo di sensibilità al derivato ST2544 (tabella 2).

I risultati sono mostrati nella seguente tabella.

Tabella 2.

Crescita del lievito *Saccharomices cerevisiae* in presenza dei derivati della camptotecina *in vivo*

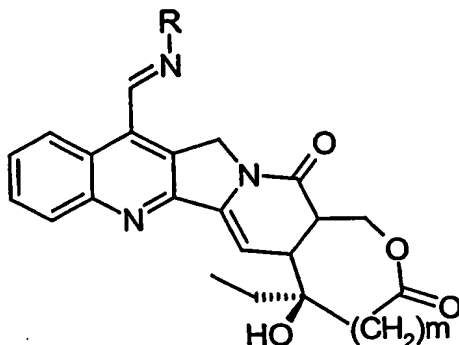
| Farmaco | TOP1 | G363C | K720E | A653P |
|---------|------|-------|-------|-------|
| DMSO    | ++++ | ++++  | ++++  | ++++  |
| ST2544  | ---- | ++++  | +- -  | ++++  |
| ST2598  | ---- | ++++  | ++++  | ++++  |

Da sinistra verso destra ogni simbolo rappresenta la crescita delle 4 diluizioni seriali di lievito.

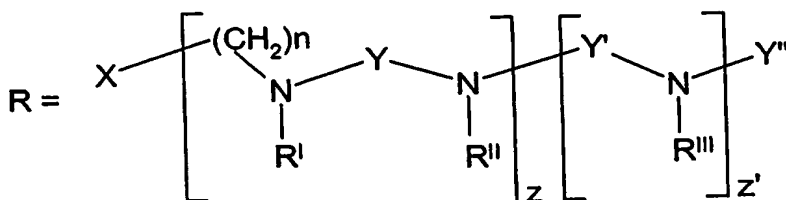
- + Vitalità del lievito *Saccharomices cerevisiae*;
- Letalità del lievito *Saccharomices cerevisiae*.

## RIVENDICAZIONI

## 1. Composti di formula generale (I)



nella quale



$m$  è il numero 0 oppure 1;

$Z$  e  $Z'$ , uguali o diversi fra loro, sono un numero intero compreso fra 0 e 2;

$Y$  e  $Y'$ , uguali o diversi fra loro, sono  $(CH_2)_{n_1}$ ;  $(CH_2)_{n_2}$ - $CH[NR^{VII}](CH_2)_{n_4}-NHR^I$ -( $CH_2$ ) $n_3$  oppure

$(CH_2)_{n_2}-N[(CH_2)_{n_4}-NHR^{IV}]-(CH_2)_{n_3}$ ;

$Y''$  è scelto tra H; cicloalcano  $C_4-C_7$ ;  $(CH_2)_{n_5}-N[CH_2-CH_2]_2N-(CH_2)_{n_6}NHR^V$ ;  $(CH_2)_{n_7}-CH[CH_2-CH_2]_2NR^V$ ;

$X$  è O, oppure è un legame semplice;

$n-n_8$ , uguali o diversi fra loro, sono un numero intero compreso fra 0 e 5;



$R^I, R^{II}, R^{III}, R^{IV}, R^V$  uguali o diversi fra loro sono un gruppo protettivo dell'azoto al quale sono legati;  $\text{CO}_2R^{VI}$ ;  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ar}$ ;  $\text{CO}_2(9\text{-fluorenilmetil})$ ;  $(\text{CH}_2)_{n5}\text{-NHCO}_2R^{VI}$ ;  $(\text{CH}_2)_{n5}\text{-NHCO}_2\text{CH}_2\text{Ar}$ ;  $(\text{CH}_2)_{n5}\text{-NHCO}_2(9\text{-fluorenilmetil})$ ,

$R^{VI}$  è un alchile lineare o ramificato ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ );

$R^{VII}$  è H oppure  $R^I\text{-}R^V$ ;

Ar rappresenta un residuo aromatico  $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ , quale fenile, eventualmente sostituito con uno o più gruppi scelti fra: alogeno, idrossi,  $\text{C}_1\text{-C}_5$  alchile,  $\text{C}_1\text{-C}_5$  alcossi, fenile, ciano, nitro,  $\text{-NR}^{VIII}R^{IX}$ , dove  $R^{VIII}$  e  $R^{IX}$ , uguali o diversi fra loro sono idrogeno, ( $\text{C}_1\text{-C}_5$ ) alchile lineare o ramificato, oppure

Ar rappresenta un gruppo eterociclico, detto gruppo eterociclico contenente almeno un eteroatomo scelto fra atomo di azoto, eventualmente sostituito con un gruppo ( $\text{C}_1\text{-C}_5$ ) alchile, e/o ossigeno e/o zolfo; detto eterociclico potendo essere sostituito con uno o più gruppi scelti fra: alogeno, idrossi,  $\text{C}_1\text{-C}_5$  alchile,  $\text{C}_1\text{-C}_5$  alcossi, fenile, ciano, nitro,  $\text{-NR}^{VIII}R^{IX}$ , dove  $R^{VIII}$  e  $R^{IX}$ , uguali o diversi fra loro sono idrogeno, ( $\text{C}_1\text{-C}_5$ ) alchile lineare o ramificato,

gli N1-ossidi, le miscele racemiche, i loro singoli enantiomeri, i loro singoli diastereoisomeri, le forme *E* e *Z*, le loro miscele, i sali farmaceuticamente accettabili.

2. Composti secondo la rivendicazione 1, in cui i gruppi protettivi sono gruppi ingombranti di carattere lipofilo.

3. Composti secondo la rivendicazione 1, in cui i gruppi protettivi sono scelti nel gruppo costituito da:  $\text{CO}_2R^{VI}$ ;  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ar}$ ;  $\text{CO}_2(9\text{-}$

fluorenilmetil);  $(CH_2)_{n_5}-NHCO_2R^{VI}$ ;  $(CH_2)_{n_5}-NHCO_2CH_2Ar$ ;  
 $(CH_2)_{n_5}-NHCO_2(9\text{-fluorenilmetil})$ , nei quali  $R^{VI}$  è come definito  
sopra.

4. Composti secondo la rivendicazione 3, in cui i gruppi protettivi  
sono scelti nel gruppo costituito da tert-butossicarbonil; benzilos-  
sicarbonil; 9-fluorenilmetilossicarbonil.

5. Composti secondo una qualsiasi dell rivendicazioni 1-4, in cui m  
è 0.

6. Composti secondo la rivendicazione 5, scelti nel gruppo che  
consiste di

- tert-butilestere dell'acido 20S-(4-{[3-(7-camptotecinilidene-  
ammino)-propil]-tert-butossicarbonil-ammino}-butil)-(3-tert-butos-  
sicarbonilammino propil)-carbammico;
- tert-butilestere dell'acido 20S-(4-{[3-(7-camptotecinilidene-  
ammino)-propil]-tert-butossicarbonil- ammino}-butil)-carbammico;
- tert-butilestere dell'acido 20S-[3-(7-camptotecinilidene-am-  
mino)-butil]-carbammico;
- 20S-7-[3-(N-tert-butossicarbonilammino)propossiiminome-  
til]-camptotecina.

7. Composti secondo una qualsiasi dell rivendicazioni 1-4, in cui m  
è 1.

8. Composti secondo la rivendicazione 7, scelti nel gruppo  
costituito da:

- tert-butilestere dell'acido 20RS-(4-[[3-(7-omocamptotecinilidene-amino)-propil]-tert-butossicarbonil-ammino]-butil)-(3-tert-butossicarbo-nilamminopropil)-carbammico;
- tert-butilestere dell'acido 20RS-(4-[[3-(7-omocamptotecinilidene-ammino)-propil]-tert-butossicarbonil-ammino]-butil)-carbammico;
- tert-butilestere dell'acido 20RS-[3-(7-omocamptotecinilideneammino)-butil]-carbammico;
- 20R,S-7-[3-(N-tertbutossicarbonilammino)propossiimmino-metil]-omocamptotecina

9. Composizione farmaceutica comprendente almeno un composto delle rivendicazioni 1-8 come principio attivo in miscela con almeno un eccipiente c/o veicolo farmaceuticamente accettabile.

10. Uso dei composti delle rivendicazioni 1-8 come medicinali.

11. Uso dei composti delle rivendicazioni 1-8 per la preparazione di un medicinale ad attività inibitrice della Topoisomerasi 1.

12. Uso secondo la rivendicazione 11 per la preparazione di un medicinale ad attività antitumorale.

13. Uso secondo la rivendicazione 11 per la preparazione di un medicinale ad attività antiparassitaria.

14. Uso secondo la rivendicazione 11 per la preparazione di un medicinale ad attività antivirale.

p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

e di ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI



Dott. Marco Spadaro

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**